

REZUMAT

al tezei de doctorat intitulată:

CERCETĂRI PRIVIND IMPLICAȚIILE FIZIOLOGICE ȘI FIZIOPATOLOGICE ALE MICROBIOMULUI ÎN DIGESTIA CÂINELUI

Doctorand: **ȘOLTZ (Răsvan Șoltz) Gianina Loredana**

Conducător științific: **Prof. Univ. Dr. CODREANU Mario**

CUVINTE-CHEIE: *microbiom, disbioză, boli gastrointestinale, acizi grași cu catena scurtă, acizi biliari, enteropatie cronică*

Teza de doctorat, intitulată ***Cercetări privind implicațiile fiziologice și fiziopatologice ale microbiomului în digestia câinelui***, este structurată în concordanță cu prevederile actuale, astfel cuprinde două părți principale:

- Partea I corespunde studiului bibliografic asociat acestuia și cuprinde 42 de pagini, reprezentând 23,0 % din volumul tezei;
- Partea a II-a prezintă Cercetări proprii și are 120 pagini, reprezentând 77 % din teza de doctorat.

Microbiomul este considerat ca parte integrantă a organismului mamiferelor și mai mult decât atât a fost de numit "organul ascuns" (Soontararak și col., 2019).

Întrucât perioada neonatală reprezintă o etapă critică pentru stabilirea și dezvoltarea microbiotei intestinale, prin influența profund asupra traiectoriei viitoare a sănătății indivizilor. Disbioza, un dezechilibru sau o perturbare a comunității microbiene intestinale, a fost asociată cu diverse afecțiuni, cum ar fi bolile inflamatorii intestinale, obezitatea și chiar afecțiuni neurologice (Beretta și col., 2023).

Ulterior, etapa pediatrică de viață este esențială pentru un start sănătos în viața cățeilor. De-a lungul vieții, mulți câini suferă de afecțiuni cronice care le afectează calitatea și speranța de viață precum și conectarea cu proprietarul. Multe dintre afecțiunile cronice sunt refractare la tratament își au originea printre factorii de risc din viața timpurie. De aceea, îmbunătățirea îngrijirii preventive veterinare și grija pentru sănătatea juniorilor în mediile în care aceștia se dezvoltă în canise și ulterior, la proprietari, reprezintă factori care vor contribui la îmbunătățirea calității vieții și prevenția unor afecțiuni cu debut tardiv.

Capitolul I din prima parte a tezei expune și sumarizează datele bibliografice a celor mai recente informații și studii clinice privind microbiomul canidelor, similitudini cu cel al oamenilor, din publicațiile cele mai recente, dat fiind faptul că acesta este ultima abordare în medicina umană.

Capitolul al II-lea din prima parte de studiu bibliografic al tezei prezintă noțiuni de bază privind microbiomul și funcțiile microbiomului la câinii adulți și juniori și rolurile diferiților taxoni bacterieni în sănătate caninelor.

Capitolul al III-lea din partea introductivă a acestei lucrări abordează rolurile microbiotei asupra diferitelor sisteme și organe precum: rolul în digestie și interacțiunile cu nutrienții din hrană și impactul diferitelor formule de hrană asupra dezvoltării optime a microbiomului sau dezvoltare aberantă a unor taxoni, metabolismul acizilor biliari, microbiomul în raport cu imunitatea/enterite/obezitate respectiv în afecțiunile dermatologice și relația digestie și sănătatea cerebrală (gut-brain axis).

Scopul primordial al studiului a constat în identificarea momentului adultizării microbiotei cățelilor în creștere și atingerea pragului de similitudine cu cel al adulților raportat la compoziția bacteriilor principale ce descriu microbiota sănătoasă normobiotică. Adicional, în subsidiar, am intenționat să identific un prim parametru funcțional din metabolomica microbiotei, respectiv nivelul acizilor biliari secundari din fecale.

Partea a II-a a tezei de doctorat, intitulată „**Cercetări personale**”, constituie aproximativ 80% din totalitatea tezei și este organizată în 4 capitole, concluzii generale și bibliografie. Rezultatele acestei lucrări sunt exemplificate prin intermediul tabelelor, graficelor și figurilor.

Primul capitol al părții a II-a, Cercetări privind contextul microbiomului digestiv al cățelilor în creștere raportat la vârstă”, a fost efectuat pe un lot de 78 căței de rasă American Akita, American Bully, Bulldog Francez, Rotweiller și Brac German cu vârste între 7-56 săptămâni. Numărul totalul de probe colectate a fost de 112 probe unice individuale, din care am alcătuit 20 de probe medii pentru testare, colectate la distanță de 2-4 săptămâni. Probele de fecale ale cățelilor au fost menținute inițial la frigider apoi transferate la -20 °C până la testarea finală prin metoda qPCR într-un laborator din Germania, cu ajutorul aparatului Roche Diagnostics și analizate prin instrumente folosite pentru interpretarea statistică, respectiv MedCalc® Statistical Software version 22.021, JMP 5.0 Professional Edition English Academic, SAS Institute GmbH, iar pentru confirmarea datelor statistice am utilizat Testul Student (testul T) și analiza ANOVA.

1. Grupul reprezentat de canidele cu vârstă cuprinsă între 7-14 săptămâni a inclus 7 probe medii provenind de la toate cele 5 rase. Datele obținute, în urma centralizării rezultatelor încărcăturii bacteriologice remarcă prezența unui cumul total de bacterii log/DNA/gram, cu o medie de 9.33 pe probele analizate, *Fecalibacterium spp.*, identificat cu media de 6.33 log DNA/g fecale sub media valorii de la adulți. *Blautia spp.* 7.09 log DNA/g fecale s-a situat sub valoarea minimă a adulților. *C. Hiranonis* 8.51 log DNA/g fecale a fost foarte puțin peste valoarea maximă a adulților. *E.coli* 6.46 log DNA/g fecale s-a situat în valorile medii normale ale adulților.

Fusobacteria spp. 6.02 log DNA/g fecale s-a situat sub valoarea minimă a adulților. *Turicibacter spp.* 8.07 log DNA/g fecale s-a situat în valorile medii normale ale adulților. Valoarea medie a acizilor biliari totali 2.12 [μmol/g] s-a situat mult sub valoarea maximă a adulților, și datorită vârstei foarte tinere.

2. Grup canide 15 - 34 săptămâni

Grupul de canide cu vârste cuprinsă între 15-34 săptămâni a inclus 7 probe medii provenite de la cele 5 rase studiate. Centralizarea rezultatelor încărcăturii bacteriologice a arătat un cumul total de bacterii log/DNA/gram, cu o medie de 9.76 log DNA/g fecale sub valoarea medie a adulților. *Fecalibacterium spp.* identificat cu media 6.88 log/DNA/g fecale valoare situată în media valorilor la adulți. *Blautia spp.* are valoare medie 7.55 log/DNA/g fecale sub valoare minimă la adulții sănătoși. *C. Hiranonis* 8.85 log DNA/g fecale a fost peste valoare maximă a adulților. *E.coli* 6.6 log DNA/g fecale s-a situat în valorile medii normale ale adulților. *Fusobacteria spp.* 6.86 log DNA/g fecale s-a situat foarte puțin sub valoarea minimă a adulților. *Turicibacter spp.* 7.83 log DNA/g fecale s-a situat în valorile medii normale ale adulților. Valoarea medie a acizilor biliari totali 2.44 [μmol/g] s-a situat mult sub valoarea maximă a adulților sănătoși.

3. Grup canide 39-57 săptămâni

Grupul de canide cu vârste cuprinsă între 39-56 săptămâni a inclus 6 probe medii provenite de la 3 rase studiate. Centralizarea rezultatelor încărcăturii bacteriologice a arătat un cumul total de bacterii log/DNA/gram, cu o medie de 9.35 log DNA/g fecale foarte sub valoarea medie a adulților.

Fecalibacterium spp. identificat cu media 6.99 log/DNA/g fecale valoare situată în media valorilor la adulți. *Blautia spp.* are valoare medie 7.11 log/DNA/g fecale sub valoare minimă la adulții sănătoși. *C. Hiranonis* 8.02 log DNA/g fecale a fost peste valoare maximă a adulților. *E.coli* 5.6 log DNA/g fecale s-a situat în valorile medii normale ale adulților. *Fusobacteria spp.* 6.87 log DNA/g fecale s-a situat foarte puțin sub valoarea minimă a adulților. *Turicibacter spp.* 7.51 log DNA/g fecale s-a situat în valorile medii normale ale adulților. Valoarea medie a acizilor biliari totali 4.2 [μmol/g] s-a situat mult sub valoarea maximă a adulților sănătoși.

La acest grup ne așteptam ca valorile parametrilor individuali să se situeze cât mai aproape de cele ale adulților sănătoși, se observă însă și un dezechilibru al raportului între tipurile microbiomului sănătos. Este probabilă intervenția unor factori externi necunoscuți, precum contaminări parazitare, care ar fi putut duce la o perturbare a dezvoltării microbiotei aspect relevant și din scorurile intestinale din tabel.

În cadrul caniselor din studiu am putut urmări analize temporale pentru 4 cuiburi diferite, respectiv rasa American Akita, rasa Brac German, American Bully și Bulldog Francez, în vederea identificării unei corelații între evoluția temporală a bacteriilor și vârsta animalului.

Rezultatele centralizate indică o diversitate datorată factorilor multipli care influențează dezvoltarea microbiomului, precum: rasa, modul de naștere și hrana

foarte diversă din punct de vedere al compoziției macronutriționale și micronutriționale în mod particular fibrele, acest factor de diferențiere respectiv vârsta în săptămâni.

Urmărind însă evoluția tuturor celor 6 specii bacteriene și a numărului de bacterii totale prin comparație cu adulții sănătoși, în graficul am observat diferențele între probe. Aceste diferențe însă nu pot fi atribuite exclusiv doar vârstei deoarece există cel puțin alte 5 variabile. Dacă toți câinii ar fi fost hrăniți cu aceeași hrană, ar fi aparținut aceleași rase și născuți în mod identic ar fi fost posibilă această diferențiere.

Se remarcă 2 probe 39 și 49 care se apropie de imaginea microbiotei adulte sănătoase cu excepție nivelul *Turicibacter spp*, care este mult sub valorile minime ale adulților. *Turicibacter spp* are rol deosebit în interacțiunea cu nivelul lipidelor gazdei: trigliceride, colesterol și acizii biliari. Are un rol deosebit în limitarea greutății excesive ca modulator al biologiei lipidelor.

Alt aspect observat sugerează că toate probele au valoare numărului de *C. hiranonis* mult peste valorile adulților sănătoși. *C. hiranonis* si-a demonstrat rolul în conversia acizilor biliari primari în acizi biliari secundari. Deficitul acestuia duce la un nivel limitat al acizilor biliari secundari cu disbioză și posibilă diaree.

Nu am identificat în literatură aspecte conexe cu nivelul ridicat al valorilor *C. hiranonis*, îndeosebi la pacienții junior sănătoși.

Analiza finală a datelor obținute indică similitudini clare ale microbiotei grupurilor la o parte din probele testate prin comparație cu limitele de referință ale câinilor adulți sănătoși.

Ținând cont de toate cele 6 bacterii testate dar și de totalul bacteriilor din fiecare probă, parametru al sănătății microbiotei, am remarcat 2 probe care sunt similar ca diversitate a bacteriilor sănătoase și prezintă microbiota cea mai similară cu cea a adulților sănătoși și anume probele: 39 (BF de 30 săptămâni) și 49 (American Bully 32 săptămâni). Ambele cuiburi a căror rezultate sunt marcate pe diagramă proveneau de la căței fătăți prin cezariană.

Cu toate acestea nici probele care au provenit de la căței cu vârste peste 40-56 săptămâni nu au prezentat o dezvoltare optimă a nivelului de *Blautia* prin comparație cu lotul martor al adulților din literatură.

Corelația între numărul total de bacterii și vârstă nu este semnificativ diferită de zero, ($p = 53.58$; $R^2 = 0.02295$). Pentru datele disponibile nu se poate stabili o corelație sau o dreaptă de regresie liniară între bacterii și vârstă. Datorită numărului limitat de probe și foarte diverse nu a putut fi stabilită o corelație clară.

Capitolul V din a doua parte a tezei de doctorat, intitulat **“Cercetări privind contextul microbiomului digestiv al cățelilor în creștere raportat la formula nutrițională”** cuprinde analiza nutrițională la subiecții incluși în studiu, respectiv 78 căței de rasă American Akita, American Bully, Bulldog Francez, Rotweiller și Brac German cu vârste între 7-56 săptămâni, cu determinări nutriționale sub raport statistic pe baza aparatului Roche Diagnostics și analizate prin instrumente folosite pentru

interpretarea statistică, respectiv MedCalc® Statistical Software version 22.021, JMP 5.0 Professional Edition English Academic, SAS Institute GmbH, iar pentru confirmarea datelor statistice am utilizat Testul Student (testul T) și analiza ANOVA.

Loturile au fost divizate în hrană industrială premium pentru căței în creștere și care respectă standarde și necesarul pentru creștere FEDIAF și hrană BARF.

Grupul A

Grupul A a inclus rasa - Rottweiler - 5 căței - 1 probă, American Akita - 1 cuib - 5 căței vârstă 10 - săptămâni, American Bully 2 cuiburi - 13 căței - din canise diferite, hrănit inițial cu o formulă extrudată super premium destinată creșterii, apoi cu produse din pet shop etichetate pentru perioada de creștere și/sau cu hrană gătită acasă. Produsele din pet shop erau complete și echilibrate, destinate etapei de creștere, singure sau în asociere cu alte alimente, specificate pentru fiecare cățel/cuib.

Grupul B este reprezentat de căței: Brac German - 3 cuiburi - 22 căței, American Bully 2 cuiburi - 13 căței, Rottweiler - 5 căței, American Akita - 1 cuib - 5 căței din canise diferite, hrăniți cu produs al unei mărci superpremium, hrană adaptată vârstei după înțărare (până la 14 săptămâni), apoi tranziționați către altă formulă completă și echilibrată destinată următoarei etapei de creștere (după 14 săptămâni), îmbogățită cu fibre probiotice, cu adaos de DHA recunoscut pentru dezvoltarea cerebrală și rolul antiinflamator, alături un complex de susținere a răspunsului imunitar, formule adaptate fiecărei vârste și talii.

Grupul C de la vârsta înțărării, 4 săptămâni a fost hrănit mixt cu produse din pet shop etichetate ca fiind destinate perioadei de creștere, însă nu respectă cerințele nutriționale cerute de FEDIAF pentru etapele de creștere, combinate cu BARF în părți egale. În acest grup am inclus rasele Bulldog francez - 5 cuiburi - 27 căței, proveniți din aceeași canisă, hrăniți cu hrană BARF și crochete destinate creșterii, dar hrană incompletă în părți egale. Acest grup nu a fost confirmat negativ pentru vreunul din paraziții intestinali.

Toate cele 3 grupuri de căței au trecut prin tranziție alimentară de 5-7 zile în săptămânile 3-5, apoi 8-10 pentru a evita factorii stresori multipli asupra cățeilor și pentru a asigura acceptarea noii hrane și adaptarea digestiei la noile formule adaptate fiecărei talii și vârste.

Datele statistice înregistrează o creștere a diversității bacteriilor odată cu înaintarea în vârstă, astfel prezenta cercetare confirmă aspecte științifice publicate în alte studii și sunt influențate de factori ai hranei precum: fibrele alimentare fermentescibile și nivelul proteic dar și raportul macronutrienților.

În cadrul evaluării în funcție de hrană, am măsurat și interferențe particulare a fiecăruia dintre nutrienții validați anterior ca și contributori la dezvoltarea optimă a microbiotei: proteinele, lipidele, fibrele.

Analizând statistic factorul nutrițional: lipide a rezultat că doar 24.1% din variația concentrației de bacterii totale poate fi explicată printr-o relație liniară în raport cu concentrația de lipide. Printre factorii care influențează concentrația de

bacterii totale se demonstrează, în continuare, că se află și concentrația de proteine și de fibre din hrană.

Analizând factorul nutrițional : proteine asupra dezvoltării microbiotei, desi ecuația de regresie este foarte semnificativă ($P=0.0117$), reușește să explice în 30,43% din varianța concentrației de bacterii totale în raport cu variațiile nivelului de proteine din formulele de hrană.

Corelația dintre concentrațiile bacteriilor totale și factorul de influență nutrițional: fibre din hrana animalelor este semnificativă ($p= 0.03$), având un grad de asociere acceptabil. Acesta aspect este surprinzător deoarece din alte studii se știe că fibrele au o contribuție majoră la dezvoltarea microbiotei digestive. Analiza statistică aplicată ar putea da aceste valori contradictorii, datorită numărului limitat de probe și diversității de factori interconectați.

Se apreciază că factorul nutriție este esențial prin totii nutrienții monitorizați și contribuția la dezvoltarea microbiotei este cu atât mai importantă cu cât cățelei respectă o hrană completă, echilibrată adaptată vârstei de creștere și administrare este consecventă și constantă pe termen lung.

În capitolul VI, "Cercetări privind contextul microbiomului digestiv al cățelilor în creștere raportat la modul de fătare, rasă și canisă", este prezentat același lot, din capitolele precedente, supus unei analize a microbiomului în raport cu modul de fătare, rasă și canisă.

Impactul modalității de naștere a fost măsurat prin corelația bacteriilor totale cu modalitatea de naștere ca parametru unic și s-au observat date relativ semnificative din punct de vedere statistic prin împărțirea cățelilor în cele două grupe.

Din datele centralizate se constată diferențe limitate, în ceea ce privește concentrația de bacterii totale în funcție de modalitatea de naștere a cățelilor. Deși s-a presupus că există diferențe semnificative între microbiota cățelilor născuți natural vaginal și cei obținuți prin cezariană, reprezentarea limitată a probelor noastre ar fi putut influența rezultatele statistice.

Impactul tipului de rasă a fost analizat conform unei structurării în funcție de rasă brahicefalică și non-brahicefalică.

Analiza statistică a fost efectuată cu ANOVA a factorului de diferențiere - Total bacterii log DNA/g fecale raportat la tipul de rasă, rase brahicefalice (nr=11) și rase nonbrahicefalice (nr=9), rezultând diferențe semnificative minore.

Pentru confirmare celor identificate cu ANOVA s-a aplicat testul Shapiro-Wilk pentru distribuția normală celor 2 grupe de rase brahicefalice (nr=11) și rase nonbrahicefalice (nr=9). Testul Shapiro-Wilk pentru distribuția normală, a relevat diferențe semnificative minore din punct de vedere statistic, pe fondul unui număr limitat de probe.

Influența canisei

Pentru a studia potențialele diferențe semnificative existente între canise, în ceea ce privește concentrația medie a bacteriilor, s-a aplicat analiza ANOVA, atunci când datele au fost normal distribuite. În acest caz s-a testat și egalitatea varianțelor. În cazul

în care varianțele nu au fost egale, dar datele sunt normal distribuite, s-a aplicat analiza Welch-ANOVA care permite analiza acestui tip de date. În situațiile în care datele nu sunt normal distribuite s-a aplicat testul Kruskal-Wallis.

Analiza Welch-Anova a generat un rezultat la semnificativ ($p = 0.084$). Rezultatul poate fi acceptat, indicând o probabilitate de 91,6% ca diferențele înregistrate între valorile medii ale bacteriilor totale în funcție de factorul CANISĂ să fie datorate acestui factor, astfel concentrația bacteriilor totale pentru rasa Bulldog Francez sunt la pragul de semnificație diferite de concentrația bacteriilor totale ale celorlalte rase.

Cuibul de American Akita relevă o întârziere a dezvoltării mediei bacteriilor totale, posibil datorită lipsei fibrelor alimentare. Cuiburile de Brac German și cel de American Bully prezintă similitudini și o normalitate a dezvoltării mediei bacteriilor totale în raport cu adulții, dar și între ei, ca urmare a hranei îmbogățite cu fibre prebiotice. Rasa Bulldog Francez prezintă un număr mai ridicat al bacteriilor totale, posibil corelat cu factorul de hrană BARF, care poate conține patogeni.

De asemenea, toate valorile medii ale concentrațiilor bacteriilor totale înregistrate pentru rasele studiate sunt în afara intervalului de $10.9 \log \text{ADN/g fecale}$ - $15.1 \log \text{ADN/g fecale}$, fiind sub valoarea minimă a intervalului pentru adulți de $10.9 \log \text{ADN/g fecale}$.

Acest aspect era așteptat și se datorează în principal faptului că microbiota câștelor junior este încă în dezvoltare. În plus, este bine cunoscut faptul că tipul de hrană, și mai precis fibrele fermentescibile din componența fibrelor alimentare totale, contribuie la creșterea diversității microbiotei și a numărului bacteriilor. Acesta este un al doilea factor care contribuie la popularea cu bacterii sănătoase și la creșterea lor numerică.

Deoarece analiza Welch-ANOVA a fost la limita semnificației, s-a optat pentru realizarea testului post-hoc Tukey-Kramer HSD pentru compararea valorilor medii ale concentrațiilor totale de bacterii. Din testul Tukey-Kramer HSD se observă că există o diferență, la limita semnificației, între concentrațiile totale de bacterii pentru rasa Bulldog Francez și American Akita. Rasele American Bully și Brac German nu diferă semnificativ din punct de vedere al valorilor medii ale bacteriilor totale.

Valorile medii ale bacteriilor totale pentru rasele American Bully și Brac German diferă la limita semnificației de cele pentru American Akita și Bulldog Francez.

Aceste rezultate pot fi clarificate mai bine prin efectuarea testului T pentru fiecare pereche de rase în parte, pentru a evidenția eventualele diferențe semnificative.

Dacă se acceptă o probabilitate de 93,6% (în loc de 95%) pentru a considera că există o diferență semnificativă între rasele American Akita și Bulldog Francez în ceea ce privește concentrația bacteriilor totale, atunci aceste două rase diferă semnificativ din acest punct de vedere.

Între canisele American Akita și Bulldog Francez există o diferență semnificativă în valorile concentrațiilor medii de bacterii totale. Când se obține o

probabilitate de $P = 0.0646$ la compararea celor două medii, se poate spune că există o probabilitate de 93,6% ca această diferență să fie datorată factorului considerat, adică canisa (care include și alți factori în cazul nostru).

Majoritatea diferențelor au putut fi observate prin compararea factorilor asemănători ai caniselor, care se aseamănă ca ritm de dezvoltare bacteriană și tip de hrană.

ANOVA pentru compararea concentrațiilor medii ale *Fecalibacterium prausnitzii* în funcție de canisă se situează în intervalul 3.4 log ADN/g fecale - 8.0 log ADN/g fecale. *Fecalibacterium prausnitzii* este una dintre bacteriile dominante la nivel digestiv.

Disponibilitatea nutrienților esențiali pentru susținerea *F. prausnitzii* poate influența distribuția acestei specii în intestin. Un studiu recent bazat pe o hartă metabolică funcțională a tulpinii *F. prausnitzii* a prezis incapacitatea acesteia de a sintetiza aminoacizii alanină, cisteină, metionină, serină și triptofan. Auxotrofia pentru vitamine și cofactori, precum biotina, folatul, niacina, pantotenatul, piridoxina și tiamina, a fost observată prin analiza ulterioară a genomurilor de *F. prausnitzii*. În schimb, această specie a fost prezisă ca producătoare de cobalamină, iar în IBD se știe că pacienții se confruntă cu deficit de cobalamină.

ANOVA pentru compararea concentrațiilor medii ale *Blautia* spp. în funcție de canisă cu testul Kruska - Wallis pentru compararea concentrațiilor medii de *Blautia* spp în funcție de canisă indică o diferență semnificativă la limita semnificației ($p = 0.073097$). Dacă se acceptă un prag statistic de $0.08 > 0.05$ atunci se poate considera că există diferențe semnificative între canise din punct de vedere al concentrațiilor de *Blautia* spp.

Pe baza datelor disponibile, se constată că în cazul concentrațiilor medii de *Blautia* spp. există diferențe semnificative doar între canisele Bulldog Francez și American Akita ($p = 0.0357$). Este greu de definit cauzalitatea diferențelor mari între cele două canise.

Despre *Blautia* spp. se știe că, în cursul conversiei flavonoidelor, reacțiile catalizate de *Blautia* includ demetilarea, dehidroxilarea și deglicozilarea, datorită enzimelor corespunzătoare, cum ar fi β -glucosidazele și O-glicozidazele.

Analizând căile metabolice cheie și enzimele legate de biotransformare, este posibil să se prevadă dacă bacteria poate efectua biotransformarea unor substanțe bioactive specifice

ANOVA pentru compararea concentrațiilor medii ale *C. hiranonis* în funcție de canisă, relevă că din punct de vedere statistic, diferențele semnificative între canise sunt limitate. Valorile SD arată variabilitatea concentrațiilor bacteriene, iar canisa cu cea mai mare variabilitate a valorilor acestei bacterii este American Akita, datorită variabilității largi între momentele recoltării probelor de la puii cuibului și a variațiilor mari ale hranei între momentele respective. Acesta ar putea fi factor inconsecvent prin comparație cu celelalte canise.

Canisa care a înregistrat cea mai mare variabilitate a valorilor concentrațiilor de *C. hiranonis* este American Akita ($SD = 2.55476 \log \text{ ADN/g fecale}$) (Tabelul 6.18). Această situație se reflectă și asupra intervalului de încredere de 95% în care se pot situa concentrațiile de *C. hiranonis* pentru animale crescute în condiții identice cu cele ale canisei American Akita. Se poate afirma că, în condițiile în care sunt crescuți puii, cu o probabilitate de 95%, valorile concentrațiilor de *C. hiranonis* din cuibul canisei American Akita se vor situa în intervalul $0.5936 \log \text{ ADN/g fecale} - 13.286 \log \text{ ADN/g fecale}$.

Variabilitatea *C. hiranonis* din acest cuib de căței s-ar putea datora faptului că a variat tipul de hrană primit. Formulele oferite după 2 luni de la înțarcare sunt inadecvate perioadei de creștere din punct de vedere nutrițional. O altă posibilă cauză a variației *C. hiranonis* la această canisă ar putea fi factorul genetic predispozant pentru IBD, știindu-se că Akita are predispoziție către IBD și, în general, patologii imunitare cu predispoziție alergică. La adulții cu IBD, *C. hiranonis* are o proporție redusă în microbiota celor investigați

Pe de altă parte, variabilitatea valorilor *C. hiranonis* între canise ar putea fi datorată hranei. American Bully și Brac German au fost hrăniți cu hrană completă și echilibrată, adaptată vârstei, care conține suficiente fibre prebiotice ce contribuie la dezvoltarea *C. hiranonis*. Toate celelalte canise au o variabilitate normală a valorilor concentrațiilor de *C. Hiranonis*.

Analiza ANOVA pentru identificarea existenței unor diferențe semnificative între concentrațiile de *E.coli* între canisele studiate a prezentat pentru canisa American Bully o singură valoare a mediei concentrației de *E. coli* care să depășească maximul admis, valoarea maximă a intervalului de încredere al mediei concentrației de *E. coli* pentru această canisă nu depășește valoarea maximă admisă.

Pentru canisa American Akita, deși toate valorile cuiburilor au fost sub limita maximă a concentrației medii de *E. coli*, variabilitatea foarte mare a valorilor înregistrate a generat un interval de încredere al mediei concentrației de *E. coli* care are limita superioară ($9.2917 \log \text{ ADN/g fecale}$) mult peste maximul admis ($8 \log \text{ ADN/g fecale}$). Aici se poate suspecta că există riscuri ca în această canisă să apară valori peste limita admisă, deoarece media pe canisă poate oricând să se situeze peste $8 \log \text{ ADN/g fecale}$.

Acest risc este asociat cu suprapopularea bacteriană cu *E. coli* patogen și cu riscuri de IBD pe termen lung, corelat și cu nivelul mai redus al *C. hiranonis*. De asemenea, nivelul ridicat de *E. coli* poate influența și un răspuns vaccinal deficitar.

Analiza ANOVA valorilor medii ale *Fusobacteria spp.* în funcție de canisă, observă că intervalele de încredere pentru American Akita și Bulldogul Francez sunt clar disjuncte și din acest motiv se suspectează că există o diferență semnificativă, între nivelurile medii de *Fusobacteria* ale celor 2 canise.

Pentru a verifica ipoteza s-a efectuat un test T pentru a compara concentrația de *Fusobacteria spp* între canisele American Akita și Bulldog Francez.

Fusobacteria spp., fiind o bacterie cu beneficii probiotice, și-a regăsit resursele în hrana caniselor American Bully și Brac German. În cazul canisei American Akita, hrana nu a conținut suficiente fibre prebiotice pentru a contribui la dezvoltarea optimă a *Fusobacteria* la această rasă. Pe de altă parte, cuiburile canisei de Bulldog Francez, fiind hrănite cu 1/2 BARF și 1/2 hrană industrială pentru juniori, au avut un aport limitat de fibre, insuficient față de nivelul recomandat, astfel observându-se o dezvoltare limitată a *Fusobacteria spp.*

Analiza ANOVA a relației dintre concentrația totală de *Turicibacter spp* în funcție de canisă, a obținut un rezultat slab semnificativ, aflat la limita semnificației ($p = 0.0588$). Datorită modalității în care sunt construite matematic analiza ANOVA și testul Tukey-Kramer HSD, în astfel de situații rezultatul obținut pentru testul Tukey-Kramer este nesemnificativ.

Menținând un prag de semnificație de 0.05, concentrațiile medii de *Turicibacter spp.* pentru rasele Brac German și Bulldog Francez nu diferă semnificativ. În cazul acceptării unui nivel de semnificație de 0.1, considerăm că există diferențe semnificative între cele două rase în ceea ce privește concentrațiile medii de *Turicibacter spp.*

Un nivel de semnificație de 0.05 indică faptul că există o probabilitate de 95% ca diferența dintre valorile medii ale *Turicibacter spp.* să fie datorată factorului canisă și doar 5% din această diferență să fie datorată întâmplării. Este posibil ca, din considerente medicale clare, să acceptăm un nivel de semnificație de 0.1, adică să acceptăm o probabilitate de 90% ca diferența existentă între valorile medii să fie datorată factorului canisă cu detaliile respective.

Există o corelație foarte bună între concentrațiile de *Fecalibacterium prausnitzii* și *Fusobacteria spp* coeficientul de corelație Pearson fiind înalt semnificativ ($p < 0.0001$). Cele 2 specii se găsesc în relație de hrănire încrucișată, nivelurile optime de *Fecalibacterium prausnitzii* vor influența nivelurile optime de *Fusobacteria spp.*

Capitolul VII din a doua parte a tezei de doctorat, intitulat “ **Cercetări privind contextul microbiomului digestive al cățelilor în creștere și nivelul acizilor biliari**” presupune analiza acizilor biliari la animalele aflate prin intermediul cromatograful de gaze sau de lichide. Pentru extracția acizilor biliari secundari o cantitate definită de fecale a fost cântărită. Acizii biliari au fost extrași în tamponul de extracție inclus în kitul de analiză al acizilor biliari peste noapte.

Conform analizei statistice se remarcă o relație semnificativă între nivelul numărului de colonii de *C.hiranonis* și nivelul acizilor biliari ($p=0.0338$), astfel mărimile se corelează invers proporțional.

Nu este surprinzătoare corelația inversă între *C. hiranonis* și totalul acizilor biliari. Aceasta poate fi atribuită și faptului că în probele medii avem și căței sub 16 săptămâni, la care valoarea acizilor biliari este redusă sub limita maximă a adulților. Dezvoltarea crescută a *C. hiranonis* a dus la valori reduse ale acizilor biliari totali. Pe de altă parte, valorile mici ale acizilor biliari corelate cu niveluri optime ale *C. hiranonis* la nivel digestiv confirmă lipsa riscului de șunturi hepatice la cățele sănătoși incluși în studiu.

Deoarece datele corespunzătoare concentrațiilor de acizi biliari nu sunt distribuite normal, comparativ cu adulții, compararea mediilor valorilor acestui parametru s-a făcut utilizând testul neparametric Kruskal-Wallis.

Se observă că nu există diferențe statistice semnificative în funcție de canisă între valorile concentrațiilor medii de acizi biliari ($p = 0.835$). Valorile mici ale acizilor biliari se pot datora în primul rând vârstei cățelilor, care sunt juniori sănătoși, fără predispoziții de rasă către șunturi hepatice.

Variabilitatea foarte mare în ceea ce privește valorile concentrațiilor de acizi biliari pentru cuibul din rasa American Akita a influențat rezultatul analizei. Din acest motiv, s-a optat pentru analiza comparativă a fiecărei perechi în parte. După verificarea normalității datelor și a egalității varianțelor, s-a decis efectuarea testelor parametrice sau neparametrice, în funcție de situație.

Analiza statistică realizată utilizând testele pentru eșantioane independente, cum ar fi testul T, testul Welch și testul neparametric Mann-Whitney, a confirmat lipsa diferențelor semnificative între valorile medii ale concentrației acizilor biliari și rasa sau canisa.

Concluzia este că relația dintre *C. hiranonis* și totalul acizilor biliari în cadrul cuiburilor studiate confirmă normalitatea metabolizării lipidelor la cățelei acelor cuiburi, indiferent de alți parametri ai cățelilor sau factori externi.

Capitolul VIII cuprinde 194 surse bibliografice citate în text.